Die mutagene Wirkung des Antibiotikums Mitomycin C auf die Oocyten der Maus

von

Achim Hübinger

1978

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0151

Aus dem
Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. G. Röhrborn

Die mutagene Wirkung des Antibiotikums Mitomycin C auf die Oocyten der Maus

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Diplom-Biologe
Achim Hübinger

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

der Dekan

gez: Prof.Dr.
H. Reinauer

1.Berichterstatter

gez: Prof. Dr. G.Röhrborn

2.Berichterstatter

gez: Prof. Dr. F.K.Ohnesorge

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung und Problemstellung	1
2.	Die Oogenese der Maus	2
2.1.	Die Oogenese während der Embryonalentwicklung und in den ersten Tagen nach der Geburt	2
2.1.1.	Die Einwanderung der primordialen Keimzellen in die Gonaden	2
2.1.2.	Die Prophase der ersten meiotischen Teilung	3
2.2.	Die Oogenese in der adulten Maus	4
2.2.1.	Follikelreifung	4
2.2.2.	Meioseverlauf	4
3.	Hormoninduzierte Follikelreifung und Ovulation	6
4.	Literaturbefunde zur Wirkung von Mitomycin C	7
4.1.	Herkunft und Beschreibung der Substanz	7
4.2.	Anwendung und biologische Wirkungen	8
4.2.1.	Anwendung in der Medizin	8
4.2.2.	Biologische Wirkungen von Mitomycin C	8
4.2.3.	Die Mutagenität von Mitomycin C	9
4.2.3.1.	Ergebnisse bisheriger Mutagenitätstests	9
4.2.3.2.	Synergistische Effekte bei der Mutagenität von Mitomycin C	9
4.2.3.3.	Schutzstoffe zur mutagenen Wirkung von Mitomycin C	12
4.3.	Die Aktivierung von Mitomycin C	12
4.4.	Der Mechanismus der mutagenen Wirkung von Mitomycin C	12
5.	Material und Methode	15
5.1.	Die Vorbehandlung der Mäuse	15
5.2.	Die Methode zur Darstellung der Metaphase II-Chromosomen	15
5.3.	Die statistische Sicherung der Ergebnisse	18
6.	Ergebnisse	19

6.1.	Die Ausbeute an auswertbaren Metaphasen	19
6.2.	Die Analyse der Metaphase II-Chromosomen	19
6.2.1.	Die Strukturellen Anomalien	19
6.2.2.	Die Gaps	21
6.2.3.	Die numerischen Aberrationen	21
6.2.4.	Zentrische Fusionen	22
6.2.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	23
7.	Diskussion	30
8.	Zusammenfassung	35
9.	Literaturverzeichnis	36

1. Einleitung und Problemstellung

Es ist heute allgemein bekannt, daß viele Chemikalien, die in unsere Umwelt gelangen, eine mutagene Wirkung haben. Die Überprüfung der Mutagenität von Arzneimitteln, Konservierungsstoffen, Pestiziden und anderer Chemikalien ist ebenso notwendig wie die Überprüfung ihrer unmittelbaren toxischen Auswirkungen. 1971 veröffentlichte die WHO deshalb Grundsätze für die Prüfung chemischer Stoffe auf Mutagenität (WHO 1971).

Hervorgehoben wird die Bedeutung von Erbgutveränderungen für den Menschen unter anderem durch Chromosomenuntersuchungen an Spontanaborten. Boué et al (1970) fanden in Aborten des ersten Trimesters 51,3% Chromosomenanomalien, Ruzicska und Czeizel (1970) beobachteten 36,4% Chromosomenanomalien in Aborten des zweiten Trimesters. Die Rate chromosomaler Anomalien bei Neugeborenen gibt Passarge (1970) mit 1:200 an.

Auch die Tatsache, daß sich bisher fast alle hinreichend auf Mutagenität getesteten Cancerogene auch als mutagen erwiesen haben (z.B. Ames et al, 1973) unterstreicht die Bedeutung der Mutagenitätsprüfung.

Für die Durchführung von Mutagenitätstests stehen heute eine Reihe von Testsystemen zur Verfügung. Bei der Wahl von Testsystemen zum Zwecke einer routinemäßigen Mutagenitätsprüfung sollte besonders die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus beachtet werden. Dies bedeutet, daß der Test Möglichkeiten der Aktivierung und Inaktivierung eines Mutagens in ähnlicher Form wie der menschliche Organismus beinhalten sollte. Auch die Verteilung der Testsubstanz im Organismus muß beachtet werden. Weiterhin sollte der Test ein möglichst breites Spektrum von Mutationstypen erfassen. Wenn der Test routinemäßig angewandt werden soll, spielen Aufwand und Kosten eine

nicht unerhebliche Rolle.

Um eine möglichst effektive und zuverlässige Erfassung von Mutagenen zu erreichen, empfiehlt es sich, verschiedene Tests sinnvoll zu kombinieren. Welche Kombinationen für welche Substanzen sinnvoll sind, kann erst nach vergleichenden Studien der Testsysteme entschieden werden.
In keinem der bisher verwendeten Testsysteme wurde die Induktion von Chromosomenaberrationen durch Mitomycin C in Oozyten von Säugern getestet. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, zu prüfen, ob Mitomycin C in Oozyten der Maus Chromosomenaberrationen auszulösen vermag und von welchem Typ diese sind.

2. Die Oogenese der Maus

Für die Versuchsplanung, insbesondere für die Wahl der Applikationszeit der zu testenden Stoffe sowie zur Interpretation der Ergebnisse ist die Kenntnis der Oogenese unerlässlich.

2.1. Die Oogenese während der Embryonalentwicklung und in den ersten Tagen nach der Geburt der Maus

2.1.1. Die Einwanderung der primordialen Keimzellen in die Gonaden

Die Gonaden der Embryonen enthalten in den ersten 10 bis 11 Tagen post conceptionem (p.c.) noch keine Keimzellen. Die primordialen Keimzellen befinden sich zu dieser Zeit noch im Entoderm des Dottersackes. Am 9. Tag p.c. gehen sie in einen amöboiden Zustand über (Blandau et al, 1963; Zamboni und Merchant, 1973) und wandern über das dorsale Mesenterium zu den Gonaden. Diesen Vorgang nennt man Keimzellenmigration; er wird möglicherweise chemotaktisch gesteuert. Während der Migration vermehren sich die Zellen durch mitotische Teilungen (Zamboni und Merchant, 1973).

Am 11. bis 12. Tag p.c. erreichen die primordialen Keimzellen die noch indifferenten Gonadenanlagen. Dort degenerieren die ersten Keimzellen und beginnen gemeinsam mit den Zellen aus dem sogenannten Keimepithel zu proliferieren und fingerförmige Epithelsprosse zu bilden: die primären Keimstränge. Spätere Generationen der Keimzellen wachsen mit sekundären Keimsträngen (Pflügersche Schläuche, Eiballen) in die Rindenzone des Ovars ein. Etwa bis zum 13. Tag der Embryonalentwicklung teilen sich die nun als Oogonien bezeichneten Keimzellen mitotisch. Nach einer letzten DNA-Synthese (Peters et al, 1962) befinden sich alle Keimzellen in der Prophase der ersten meiotischen Teilung (Borum, 1961). Borum (1961) schätzt, daß alle Zellen innerhalb von ein bis zwei Tagen in die Meiose eintreten. Nach dem Eintritt in die Meiose werden die Keimzellen als Oozyten bezeichnet.

2.1.2. Die Prophase der ersten meiotischen Teilung

Die Oozyten durchlaufen die Prophase der ersten meiotischen Teilung weitgehend synchron (Hartung und Stahl, 1977). Am 5. Tag nach der am 19. Tag p.c. stattfindenden Geburt haben die Oogonien die Stadien Präleptotän, Leptotän, Zygotän, Pachytän und Diplotän vollendet. Vom Diplotän gehen die Oozyten in das Dictyotän über. In diesem Stadium verbleiben die Oozyten bis kurz vor der Ovulation. Im Dictyotän liegen die Chromosomen in einem interphaseähnlichem, maximal entspiralisiertem Zustand vor (Tsuda, 1965; Röhrborn und Hansmann, 1971). Eine Lampenbürstenstruktur, wie sie bei vielen anderen Organismen beobachtet wurde, konnte bisher bei der Maus nicht eindeutig nachgewiesen werden. Baker und Franchi (1967) vermuten aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen, daß auch bei Säugern ein im höchsten Grade diffuses Lampenbürstenstadium in Oozyten vorkommt. Zu Beginn des Dictyotäns wird die Oozyte mit einer Schicht somatischer Zellen umlagert: die Bildung des Primärfollikels beginnt. Möglicherweise ist dieser Vorgang mitentscheidend für den Eintritt der Oozyten in das Dictyotän (Ohno und

Smith, 1964; Tsafiri und Channing, 1975).

2.2. Die Oogenese in der adulten Maus

2.2.1. Follikelreifung

Unter dem Einfluß gonadotroper Hormone entwickelt sich der Primärfollikel zum Graafschen Follikel mit dem charakteristischen Cavum folliculi. FSH (Follikel stimulierendes Hormon) aus dem Hypophysenvorderlappen ist für das initiale Follikelwachstum verantwortlich. Die Endreifung der Follikel sowie die Ovulation werden durch das ebenfalls im der Hypophyse gebildete LH (luteinisierendes Hormon) gefördert.

2.2.2. Meioseverlauf

LH stimuliert auch die Oozyten zur Fortsetzung der Meiose (Edwards, 1966). Dies wird zunächst an einer erneuten Kontraktion des Chromatins sichtbar. Innerhalb weniger Stunden durchlaufen die Chromosomen die Stadien der Prophase noch einmal (Röhrborn und Hansmann, 1971). Bereits etwa drei Stunden nach dem Ende des Dictyotäns löst sich die Kernmembran auf, ein Spindelapparat bildet sich, und die Chromosomen werden darauf in der Anaphase I getrennt; es bilden sich zwei Tochterkerne mit je 20 Univalenten. Die Univalente dieser haploiden Kerne bestehen aus je zwei Chromatiden, die nur an den akrozentrisch gelegenen Zentromeren verbunden bleiben. Mit der anschließenden Telophase I endet die erste meiotische Teilung, die auch Reduktionsteilung genannt wird, da hierbei aus einer diploiden zwei haploide Zellen entstehen. Eine dieser beiden Zellen, die sekundäre Oozyte, erhält den größten Teil des Zytoplasmas. Die andere Zelle ist also viel kleiner und wird als das erste Polkörperchen bezeichnet. Die sekundäre Oozyte tritt direkt oder nach einer kurzen Interkinese mit nur teilweiser Entspiralisierung der Chromosomen in die zweite

meiotische Teilung ein. Diese entspricht einer mitotischen Teilung mit dem Unterschied, daß es sich hier um eine haploide Zelle handelt und das die Zentromeren gespalten werden müssen.Wiederum ensteht neben der Oozyte ein Polkörperchen.

Während der Metaphase II findet die Ovulation statt. Die Oozyten befinden sich danach in der Pars ampullaris der Tuba uterina. Hier dringen die Spermien in die Oozyten ein, etwa drei bis fünf Stunden nach der Ovulation (Snell und Stevens, 1966). Es wurde beobachtet, daß erst nach Eindringen der Spermien die weiteren Stadien der zweiten meiotischen Teilung ablaufen können (Edwards, 1966; Kuhlmann, 1970). Röhrborn und Hansmann (1971) beobachteten in (101xC3H)F_1-Hybriden auch noch den Ablauf von Anaphase II und Telophase II in unbefruchteten Oozyten; der Zeitpunkt der Degeneration der unbefruchteten Oozyten könnte also stammesspezifisch variieren.

Wenn eine Befruchtung stattgefunden hat, existieren der Nucleus der Oozyte sowie der Spermakopf zunächst als Pronuclei, in denen zehn bis zwölf Stunden nach der Befruchtung die erste DNA-Synthese stattfindet (Sirlin und Edwards, 1959). Durch die Karyogamie wird zwanzig bis fünfundzwanzig Stunden nach dem Einrdingen der Spermien der diploide Zustand der Zelle hergestellt und der Befruchtungsvorgang abgeschlossen.

3. Hormoninduzierte Follikelreifung und Ovulation

Im Experiment kann die Follikelreifung und Ovulation durch FSH (Follikel stimulierendes Hormon) und LH (luteinisierendes Hormon) induziert werden (Edwards und Gates, 1959). Man erhält auf diese Weise, zumindest bei erstmaliger Anwendung bei einer Maus, bis zu 70 Oozyten pro Maus und Zyklus. Ohne Hormongabe kommen nur etwa 10 Follikel zur Ovulation, die anderen degenerieren in der Phase sinkenden FSH-Spiegels.

Die durch Hormonapplikation erhaltenen Oozyten können durchaus befruchtet werden und eine normale Entwicklung durchlaufen. Man stellte jedoch fest, daß ein großer Teil der daraus entstehenden Embryonen abstirbt. Es wurde deshalb die Frage gestellt, ob hier nicht anormale Oozyten produziert würden. Man nahm zunächst an, daß eine zu dichte Besetzung des Uterus mit Implantaten der Grund für das Absterben derselben sei (Edwards, 1966). Neuere Untersuchungen über die Wirkung des PMS (pregnant mares serum), das in den meisten Fällen als FSH verwandt wird, haben gezeigt, daß PMS die Hormonproduktion in den Ovarien nach erfolgter Ovulation nachhaltig beeinflußt (Cook et al, 1974; Karsch und Sutton, 1976). Bei der Ratte führt die Gabe von PMS fünf Tage nach der Befruchtung zum Untergang sämtlicher Implantate durch inadäquate Hormonproduktion der Ovarien (Chatterjee et al, 1977). Es muß diskutiert werden, ob das Absterben von Implantaten nach Stimulation der Ovulation nicht mit diesem Effekt des langwirksamen PMS zusammenhängt.
Sowohl bei Absterben der Implantate durch zu dichte Besetzung des Uterus als auch bei Absterben der Implantate durch inadäquate Hormonproduktion besteht kein Grund zur Annahme, daß die durch hormoninduzierte Follikelreifung und Ovulation produzierten Oozyten anormal sind.

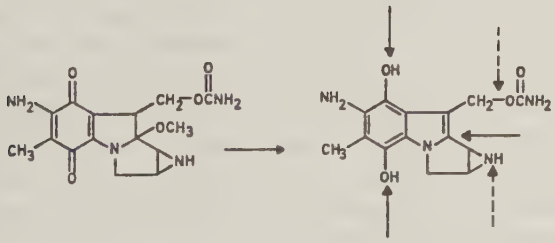
4. Literaturbefunde zur Wirkung von Mitomycin C

4.1. Herkunft und Beschreibung der Substanz

Mitomycin C ist ein Antibioticum, das fermentativ aus Streptomyces caespitosus gewonnen wird (Hata et al, 1956; Wakaki et al, 1958; Perlman, 1974). Die reine Substanz kommt als blauviolette, gut wasserlösliche Kristalle in den Handel. In gelöster Form ist sie licht- und temperaturempfindlich und sollte vor Licht geschützt "im Kühlschrank" aufbewahrt werden.

Die Isolation, Chemie und Strukturformel (Hata et al, 1956; Webb et al, 1962), die Pharmakologie und Toxikologie (Philips et al, 1960; Karnofsky und Clarkson, 1963), klinische Tests (Mannheimer und Vital, 1966) wurden beschrieben. Die Grundstruktur des Mitomycin C ist das von Webb et al (1962) beschriebene Mitosan. Die Substanz ist in der isolierten Form inaktiv. Erst nach chemischer oder enzymatischer Reduktion wird sie zu einem biologisch aktiven Agens (Szybalski und Iyer, 1967). Abbildung 1 zeigt das Molekül in der inaktiven (=oxydierten) sowie in der aktiven (=reduzierten) Form.

Abbildung 1



a) oxydierte, inaktive Form, b) reduzierte, aktive Form des Mitomycin C. ----→ :reaktive Gruppen, ——→ : Gruppen, die reduziert worden sind. (nach Szybalski und Iyer, 1967).

4.2. Anwendung und biologische Wirkungen

4.2.1. Anwendung in der Medizin

Shatkin et al (1962) beschrieb die zytostatische Wirkung von Mitomycin C. In der Medizin macht man sich diese Wirkung zunutze und wendet dieses Zytostatikum zur Chemotherapie von Tumoren an, vornehmlich bei verschiedenen Sarkomen und bösartigen Systemerkrankungen (z.B. Kobayashi, 1960; Bast et al, 1976).

4.2.2. Biologische Wirkungen von Mitomycin C

Die zytostatische Wirkung wurde bereits erwähnt. Reich et al (1961) beschrieb die bakterizide Wirkung sowie den DNS-Abbau durch Mitomycin C. Die DNS-Synthese wird gehemmt (Shiba et al, 1959; Helmstetter et al 1968), Translation und Transcription bleiben jedoch weitgehend unbeeinflußt (Shiba et al, 1959; Sekiguchi et al, 1959). Mitomycin C induziert somatische Crossover (Shaw und Cohen, 1965; Suzuki, 1965; Holliday, 1964; Comings, 1975; Moore und Holliday, 1976) und hemmt Mitosen (Nowell, 1964; Cohen und Shaw, 1964; Manyak und Schleiermacher, 1973). Bacteriophagen können durch Mitomycin C ebenso induziert werden (Otsuji et al, 1959; Roberts und Roberts, 1975) wie Viren bei Eukaryonten (Rakusanova et al, 1976; Morris et al, 1977; Lavialle et al 1977). Außerdem wurden beschrieben: die Induktion von Endotoxinen und Bactericinen (Tyler und Shemat, 1975; Mahony 1977; Isaacson und Moon, 1975), Beeinflussung von Enzymsynthesen (Chou und Robinson, 1977; Bulmer et al, 1976; Cheer und Tchen, 1962, 1963), die Freisetzung von H_2O_2 aus Zell-Extrakten (Tomasz, 1976) und die Hemmung der Interferron-Produktion (Szolgay und T'alas, 1976). Bieliavinsky (1963) stellte eine Hemmung der Amphibienentwicklung im Morula-Stadium fest. Takaya (1965) wies die Teratogenität von Mitomycin C bei der Ratte nach, Ito (1967) bei der Maus, Singh und Singh (1976) an Hühnerembryonen. Mitomycin C erwies sich auch als

carcinogen (Ikegami et al, 1967; Schmähl und Osswald, 1970;). Zur mutagenen Wirkung siehe 4.2.3..

4.2.3. Die Mutagenität von Mitomycin C

4.2.3.1. Ergebnisse bisheriger Mutagenitätstests

Die Mutagenität von Mitomycin C wurde sowohl in vivo als auch in vitro oftmals nachgewiesen. Außerdem erhöht Mitomycin C die die Zahl der Austausche im SCE-Test (=sister chromatid exchange-Test). Die Tabellen 1, 2 und 3 geben eine Übersicht über die bisherigen Untersuchungen. Die Verteilung Mitomycin C-induzierter Aberrationen auf bestimmte Abschnitte des Chromosoms wird in der Diskussion (s. 7.) beschrieben.

4.2.3.2. Synergistische Effekte bei der Mutagenität von Mitomycin C

White (1964) beobachtete einen synergistischen Effekt von Cyanid und Phenäthylalkohol mit Mitomycin C bei der bakteriziden Wirkung. Inzwischen wurden eine Reihe von Mitomycin C-Synergisten in Bezug auf die mutagene Wirkung beschrieben. Mehrfach untersucht wurde der Synergismus mit Coffein, so zum Beispiel beim Chinesischen Hamster (Hartley-Asp und Kihlmann, 1971). Ehling (1971a) untersuchte das Zusammenwirken von γ-Strahlen und Mitomycin C im dominant-letal-Test bei der Maus. Untersuchungen von Tsukamura und Tsukamura (1962) mit Mycobacterien ergaben dagegen keinen Synergismus für die kombinierte Anwendung von Mitomycin C und UV-Licht. Eine Untersuchung von Schubert und Rieger (1976) über die synergistische Wirkung des Harnstoffes zeigt keinen Effekt dieser Substanz auf die Zahl der Mitomycin C-induzierten Aberrationen bei Vicia faba, wohl aber Änderungen im Spektrum der Aberrationstypen.

Tabelle 1: Mutagenitätsbefunde mit Mitomycin C

Organismus	Mutagenität	Autoren
E.coli	+	Iijima und Hagiwara, 1960
	+	Reich et al, 1961
	+	Zampieri und Greenberg, 1967
	+	Kondo et al, 1970
	+	Green et al, 1976
E.coli/Rhesusaffe[3]	+	Maier et al, 1978
Salmonella	+	Garbridge und Legator, 1969
	+	Alper und Ames, 1975
Salmonella/Maus[3]	-	Garbridge und Legator, 1969
Mycobacterium	+	Tsukamura und Tsukamura, 1962
Vicia faba	+	Merz, 1961
	+	Rao und Natarajan, 1967
	+	Natarajan und Ahnström, 1969
	+	Utsumi, 1970
	+	Shah, 1975
	(+)[1]	Schubert und Rieger, 1976
	+	Hartley-Asp, 1976
	+	Kihlman und Sturelid, 1978
Tradescantia	(+)[2]	Utsumi, 1970
Nigella damascena	(+)[2]	Natarajan und Ahnström, 1969
	(+)[2]	Hartley-Asp, 1976
Allium proliferum	+	Hartley-Asp, 1976
Drosophila	+	Mukherjee, 1965
	+	Schewe et al, 1971
	+	Walker und Williamson, 1975
Habrobracon	+	Smith, 1969
Bombyx mori	+	Inagaki und Oster, 1969
Maus	+	Ehling, 1971a, 1971b, 1974
	+[4]	Ehling und Neuhäuser, 1973
	-	Gilliavod und Leonard, 1971
	+	Adler, 1973, 1974, 1976
	+	Manyak und Schleiermacher, 1973
	+	Surkova und Malashenko, 1975
	+	Cattanach, 1975
	+	Hitosumachi und Kikuchi, 1976
Rhesusaffe	+	Michelmann et al, 1978

+: Mutagenität nachgewiesen
-: keine Mutagenität nachgewiesen
1: kein Kontrollwert angegeben
2: schwache Mutagenität bei Organismen mit heterochromatinarmen Chromosomen
3: host mediated assay
4: Untersuchung resistenter Stadien der Spermatogenese

Tabelle 2: Mutagenitätsbefunde bei Mitomycin C in Zellkulturen

Herkunft der Zellkultur	Mutagenität	Autoren
Protorous tridactylis	+	Harley-Asp, 1976
Frosch	-[1]	Shah, 1975
chin. Hamster	+	Natarajan und Schmid, 1971
	+	Hartley-Aps, 1976
	+	Perry und Evans, 1975
Mensch	+	Cohen und Shaw, 1964
	+	Nowell, 1964
	+	Shaw und Cohen, 1965
	+	Cohen, 1969
	+	Brogger und Johansen, 1972
	+	Morad et al, 1973
	+	Brogger, 1974
	+	Bourgeois, 1974
	+	Funes-Cravioto et al, 1974
	+	Ayraud et al, 1975

+: Mutagenität nachgewiesen
1: "almost no effect", Organismus mit heterochromatinarmen Chromosomen

Tabelle 3: SCE-Befunde mit Mitomycin C, in vitro und in vivo

Organismus bzw. Zellkultur	Zahl der SCE vermehrt	Autoren
Vicia faba	+[1]	Kihlman und Sturelid, 1978
Maus	+[1]	Allen und Latt, 1976a
	+[1]	Allen und Latt, 1976b
	+[1]	Lin und Alfi, 1976
	+[1]	Kram et al, 1977
chin. Hamster	+	Kato und Shimada, 1975
	+	Moore and Holliday, 1976
	+	Perry und Evans, 1975
Kaninchen	+[1]	Stetka et al, 1977
Muntjak	+	Huttner und Ruddle, 1976
	+	Johnstone und Carrano, 1977
Mensch	+	Latt, 1974
	+	Latt et al, 1975

+: Zahl der SCE durch Mitomycin vermehrt
1: in vivo Untersuchungen

4.2.3.3. Schutzstoffe zur mutagenen Wirkung von Mitomycin C

Als Schutzstoff oder Antimutagen von Mitomycin C wurde Adenosintriphosphat beschrieben (Bempong und Newsome, 1972). In vitro kann die Zahl der durch Mitomycin C induzierten Brüche durch Katalase, Superoxid-Dismutase und Radikalfänger vermindert werden (Lown et al, 1975).

4.3. Die Aktivierung von Mitomycin C

Die beschriebene mutagene Wirkung setzt eine Aktivierung des Mitomycin C voraus (s.a. 4.1. und Abb.1). Szybalsky und Iyer (1964 und 1967) schlagen ein Modell vor, demzufolge eine Reduktion des Chinons zum Hydrochinon die Bildung eines Indolringes ermöglicht. Die Methoxylgruppe an C_{9a} wird daraufhin abgespalten. Es entstehen zwei reaktive Gruppen am Azaridinring sowie am C_{10}-Atom. Murakami (1966) und Lown et al (1975) weisen außerdem auf die Enstehung von Radikalen durch Bildung des Semichinons hin, die ebenfalls zur mutagenen Wirkung beitragen können. In jedem Fall ist jedoch eine Reduktion Vorraussetzung der Aktivierung.
Die metabolische Aktivierung wird wahrscheinlich durch eine NADH-abhängige Chinonreduktase katalysiert (Szybalsky und Iyer, 1967).
Natriumborhydrid ($NaBH_4$), Natriumdithionid ($Na_2S_2O_4$) sowie Wasserstoff in Gegenwart von Palladium als Katalysator vermögen Mitomycin C in vitro zu aktivieren (Szybalsky und Iyer, 1967). Eine Aktivierung mit Leberhomogenaten ist ebenfalls möglich.

4.4. Der Mechanismus der mutagenen Wirkung von Mitomycin C

Es wurden mehrere Mechanismen vorgeschlagen, um den DNA-Abbau sowie die Enstehung von Mutationen durch Mitomycin C zu erklären. Reich et al (1961) hielten eine Beteiligung von Nucleasen für möglich, da der DNA-Abbau - wie die

Aktivität der Nucleasen - Mg^{++}-Ionen benötigt. Kersten (1962) diskutierte eine Freisetzung ribosomal gebundener Nucleasen durch Mitomycin C. Kodama (1967) interpretierte seine biophysikalischen Untersuchungen über den DNA-Mitomycin C-Komplex als eine Interkalation der Mitomycin C-Moleküle nach Art der Acridine. Klarheit brachten erst Untersuchungchungen von Iyer und Szybalsky (1963), die zeigen konnten, daß Mitomycin C die beiden DNA-Stränge der Doppelhelix kovalent zu verbinden in der Lage ist. Eine solche Bindung wird als Crosslink bezeichnet. Die an Bakterien-DNA durchgeführten Arbeiten wurden später auch für DNA aus Säugerzellen bestätigt (z.B. Fornace und Little, 1977). Man muß daher davon ausgehen, daß Mitomycin C eine bifunktionelle alkylierende Substanz ist, die einerseits Crosslinks bildet, andererseits die DNA natürlich auch monofunktionell alkylieren kann. Die Crosslinks erklären auch den DNA-Synthese Stop durch Mitomycin C.

Die Crosslinks stellen noch keine Mutationen dar, erst recht keine Aberrationen. Sie werden jedoch von Reparaturenzymen erkannt. Dies gilt sowohl für Bakterien (Boyce und Howard-Flanders, 1964; Terawaki und Greenberg, 1966; Kersten und Kersten, 1969; Pekhov et al, 1976; West und Emmerson, 1977) als auch für Eukaryonten (Ayraud et al, 1975; Fujiwara und Tasumi, 1975). Bei der Reparatur - es werden mehrere Mechanismen diskutiert (Übersicht bei Cole und Sinden, 1975) - kann es dann zu "Unfällen" kommen, deren Resultat eine Chromosomenaberration sein kann.

Die Beteiligung der Reparaturenzyme an der Entstehung von Aberrationen ist von Bedeutung für die Durchführung von Mutagenitätstests; sie muß bei der Beurteilung der sensitiven Phasen sowie bei der Ausprägungszeit nach dem Einwirken der Noxe berücksichtigt werden!

Von der monofunktionellen Alkylierung ist bekannt, daß sie auch direkt zu Einzellstrangbrüchen der DNA und über diese

zu Aberrationen führen kann (z.B. Röhrborn 1970). Lown et al (1975) fand Hinweise für die Entstehung von Hydroxylradikalen durch Mitomycin C (s.a. 4.3.). Diese Radikale könnten ebenfalls Einzellstrangbrüche hervorrufen. (Dieser Mechanismus würde auch die Bildung von H_2O_2 durch Mitomycin C (s.4.2.2.) sowie die Wirkung einiger Schutzstoffe (s.4.2.3.3.) erklären.) Bei vorhandenen Einzellstrangbrüchen entstehen leicht durch Nucleasen oder mechanische Einflüsse Doppelstrangbrüche, die zu zytologisch sichtbaren Aberrationen führen können.

Für zwei Wirknugsmechanismen des Mitomycin C, nämlich der direkte Bruch der DNA sowie der Bruch bei Reparaturvorgängen spricht auch, daß sowohl eine "sofortige" wie auch eine "verzögerte" mutagene Wirkung beschrieben wurde.

Die Typen der durch Mitomycin C hervorgerufenen Aberrationen sowie die sensitiven Phasen der Mitomycin C-Mutagenität werden in der Diskussion erläutert (s.7.).

5. Material und Methode

5.1. Die Vorbehandlung der Mäuse

In der vorliegenden Arbeit wurden acht bis zwölf Wochen alte NMRI-Mäuse verwendet. Diese wurden bei 22°C und bei 50-70% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Der Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch Zeituhren geregelt; die Dunkelperiode dauerte von 18^{00} bis 6^{00} Uhr.

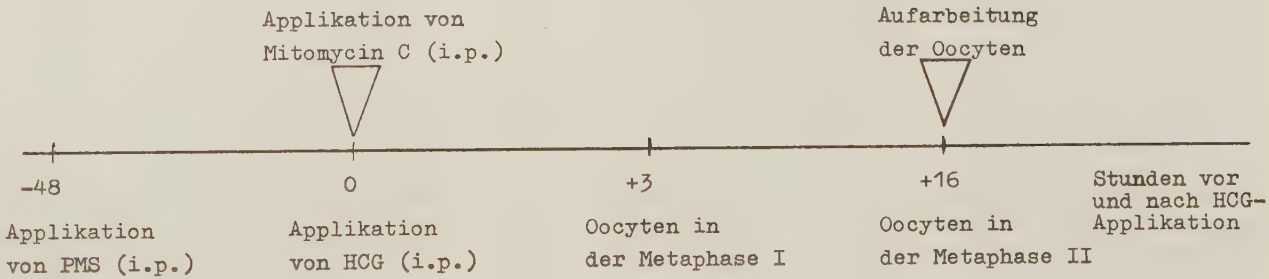
Die Ovulation der Mäuse wurde nach der Methode von Fowler und Edwards (1957) mit PMS (pregnant mares serum) und HCG (human chorion gonadotropin) stimuliert (s.a. 3.). Alle Tiere bekamen 1,5 I.E. PMS in 0,5ml 0,9% NaCl-Lösung intraperitoneal injiziert. 48 Stunden später erhielten alle Tiere 2 I.E. HCG in 0,5ml 0,9% NaCl-Lösung, ebenfalls intraperitoneal.
Verwendet wurde HCG (Predalon) der Firma Organon und PMS (Intergonan) der Firma Vemie.

5.2. Die Methode zur Darstellung der Metaphase II-Chromosomen

Die Aufarbeitung der Oozyten erfolgte 16 Stunden nach der Applikation von HCG mit der Methode von Röhrborn und Hansmann (1971). Der Zeitablauf des Versuchs bis zu diesem Schritt ist in Abbildung 2 dargestellt. 16 Stunden nach der HCG-Applikation befinden sich fast alle Oozyten in der Metaphase II. Die Mäuse wurden durch Dislokation des Genickes getötet. Danach wurde der Eileiter entnommen und in ein Blockschälchen mit 37°C warmer Hank's-Lösung übertragen. Die Oozyten sind zu diesem Zeitpunkt in der Ampulle, einem erweiterten Bezirk des Eileiters, gut sichtbar.

Im nächsten Arbeitsgang wird die Ampulle unter einem Stereomikroskop mit Präpariernadeln zerrissen. Die Oozyten

Abbildung 2: Versuchsablauf bis zur Analyse der Chromosomen der unbefruchteten Metaphase II-Oocyten. (Verändert nach Röhrborn und Hansmann, 1971)



sind noch vom Cumulus oophorus umgeben und können jetzt als zusammenhängende Ballen mit der Pinzette in ein Blockschälchen mit Hyaluronidase (150 I.E. Hyaluronidase in 1ml Ringerlösung) übertragen werden. Verwendet wurde Hyaluronidase (Kinetin) der Firma Schering. Die Oozyten verbleiben 30 Minuten in dieser Lösung, damit die Ablösung der Corona radiata von den Eizellen stattfinden kann.

Im folgenden Schritt werden die Eizellen mit einer fein ausgezogenen Pipette in ein Blockschälchen mit 1,5%iger Natriumcitratlösung übertragen. In dieser hypotonen Lösung verbleiben die Oozyten bei 4°C bis zur Fixierung, und zwar mindestens 45 Minuten. Wenn die hypotone Behandlung länger dauert als 2 Stunden und 30 Minuten wird die Ausbeute an brauchbar dargestellten Metaphase II-Chromosomen schlecht. Dieser Schritt begrenzt daher die pro Arbeitsgang fixierbaren Oozyten.

Fixiert werden die Metaphase II-Chromosomen, indem die Oozyten mit einer Pipette auf einen sauberen, fettfreien, trockenen und kühlen Objektträger gebracht werden und hier mit Fixativ (3 Teile Methanol, 1 Teil Essigsäure) bis zum Platzen betropft werden. Auch dieser Schritt wird unter dem Stereomikroskop ausgeführt. Danach werden die Präparate mindestens 60 Minuten luftgetrocknet und sodann mit 2% Orceinessigsäure gefärbt. Nach weiteren 60 Minuten werden die Objektträger aus dem Färbebad genommen und in Alkohollösungen mit steigender Konzentration gewaschen (2 mal 75%iger Alkohol, 2 mal 95%iger und 2mal absoluter Alkohol, jeweils 2 bis 5 Minuten). Dann werden die Präparate 60 Minuten in Xylol aufbewahrt, bevor sie mit Eukitt eingedeckelt werden.

Insgesamt wurden 200 Mäuse aufgearbeitet. 50 Mäuse erhielten zum Zeitpunkt der HCG-Applikation zusätzlich 0,5ml destilliertes Wasser injiziert(i.p.); sie bildeten die Kontrolle (Gruppe 1). Je 50 weitere Mäuse erhielten 5mg/kg Mitomycin C (Gruppe 2), 10mg/kg (Gruppe 3) und schließlich noch

20mg/kg Mitomycin C (Gruppe 4) in destilliertem Wasser zur Zeit der HCG-Applikation (s. Abb. 2). Verwendet wurde Mitomycin C der Firma Kyowa Hakko Kogy Co., Tokyo. Das durchschnittliche Gewicht der Mäuse betrug 29,5g. Jede Maus wurde vor Applikation des Mitomycin C gewogen. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede der Durchschnittsgewichte der einzelnen Gruppen.

5.3. Die statistische Sicherung der Ergebnisse

Die statistische Sicherung der Ergebnisse erfolgt mit der χ^2-Methode. Bei Anwendung des einseitigen Tests wird $p < 0,01$ als signifikant angesehen. Die p-Werte sind in Tabelle 5 aufgeführt.

6. Ergebnisse

6.1. Die Ausbeute an auswertbaren Metaphasen

Die Zahl der aus der Hyaluronidaselösung entnommenen Oozyten war in allen vier Gruppen des Versuchs etwa gleich (s. Tab. 4). Es konnte also kein zytotoxischer Effekt des Mitomycin C auf die Oozyten festgestellt werden. Aus Zeitgründen (begrenzte Verweildauer der Oozyten in der hypotonen Lösung, s. 5.2.) konnten nicht alle Oozyten fixiert werden. Die Zahlen der fixierten Oozyten sowie der Anteil der daraus erhaltenen auswertbaren Metaphasen II sind in Tabelle 4 aufgeführt. Der zunehmende Anteil auswertbarer Metaphasen II in den Versuchsgruppen beruht auf zunehmender Übung des Untersuchers, erreicht aber bereits in Gruppe 1 den Laborstandard. Ausgewertet wurden nur Metaphasen mit mindestens 18 Chromosomen (zur Diskussion der Hypoploidien s. 7.).

6.2. Die Analyse der Metaphase II-Chromosomen

6.2.1. Die strukturellen Anomalien

Wie zu erwarten (s. 7.) traten vorwiegend Chromatidenaberrationen auf. Diese wurden erfaßt als Brüche, Fragmente, Deletionen und Chromatidenverluste. Die einzigen Chromosomenaberrationen stellten die Ringchromosomen dar. Brüche wurden nur dann als solche gewertet, wenn neben der Unterbrechung des Chromosoms eine Dislokation der Bruchenden zu bemerken war. Als Fragmente wurden freiliegende azentrische Chromatidenstücke gezählt. Deletionen traten als Verkürzung eines Chromatids in Erscheinung; oft fehlte jedoch, soweit erkennbar, ein ganzes Chromatid. Diese Chromatidenverluste wurden in Tabelle 5 getrennt von den übrigen Deletionen aufgeführt. Chromatidenverluste wurden nur dann ausgewertet, wenn alle anderen Chromosomen der betreffenden Metaphase aus zwei einwandfrei am Zentromer verbundenen Chromatiden bestanden.

Tabelle 4 Anzahl der fixierten Oozyten und Anteil der auswertbaren Metaphasen II

Versuchs-gruppe	Mitomycin C pro Maus (mg/kg)	Oozyten nach Hyaluronidase-behandlung	Oozyten nach Hyaluronidase-behandlung/Maus	fixierte Oozyten	auswertbare Metaphasen(%)	auswertbare Metaphasen/Maus
1	0	939	18,78	607	26,7	3,24
2	5	815	16,30	684	35,5	4,86
3	10	961	19,22	667	48,3	6,44
4	20	832	16,64	609	72,4	8,82
Gesamt		3547	17,73	2567	45,5	5,84

Jede Versuchsgruppe besteht aus 50 Mäusen. Mitomycin C wurde intraperitoneal verabreicht, und zwar 16 Stunden vor dem Aufarbeiten der Mäuse. Die Anzahl der Oozyten ist nach der Hyaluronidase-behandlung bestimmt worden, da die Oozyten vorher - vom Cumulus oophorus umgeben - schlecht zählbar sind.Der Anteil der auswertbaren Metaphasen ist in Prozent der fixierten Oozyten angegeben.

Es wurden insgesamt 15 Metaphasen mit Brüchen, 15 mit Fragmenten, 1 mit Ringen, 8 mit Deletionen und 9 Metaphasen mit Chromatidverlusten gefunden. Die Verteilung dieser Aberrationen auf die Versuchsgruppen ist aus Tabelle 5 zu entnehmen. Die Abbildung 6 zeigt eine Deletion, die Abbildung 7 einen Chromatidverlust und einen Bruch, die Abbildungen 8, 9 und 10 jeweils einen Bruch.

6.2.2. Die Gaps

Gaps stellen achromatische Läsionen dar, bei denen die Kontinuität des Chromosoms jedoch erhalten zu sein scheint. Es ist unklar, welche Veränderungen des Chromosoms als Gap in Erscheinung treten. Die Gaps werden in der vorliegenden Arbeit deshalb nicht bei der Berechnung der Rate struktureller Aberrationen in engerem Sinne berücksichtigt. Gewertet wurde als Gap eine Unterbrechung des gefärbten Chromosoms ohne Dislokation der angefärbten Abschnitte. Gefunden wurden zwei Metaphasen mit Gaps in Gruppe 4 (s. Tab. 5).

6.2.3. Die numerischen Aberrationen

Beobachtet wurden diploide Metaphasen II, Hyperploidien (21 Chromosomen) und Hypoploidien (18 und 19 Chromosomen). Bei der Auswertung der diploiden Metaphasen II muß beachtet werden, daß die Chromosomen des 1. Polkörperchens dicht bei den Chromosomen der Oozyte liegen können. in der Regel sind die Chromosomen des 1. Polkörperchens jedoch leicht von denen der Oozyte zu unterscheiden. In seltenen Fällen kann dies jedoch schwierig sein.

Unter der Fixierung der Metaphasen kann es leicht zu einem Wegschwimmen von ein oder mehreren Chromosomen kommen. Auf diese Weise entstehen Artefakte, die Hypoploidien vortäuschen können (diskutiert in 7.). In der vorliegenden

Arbeit werden die "Hypoploidien" nicht als Aberrationen gewertet. Zudem waren Hypoploidien in allen Versuchsgruppen gleich häufig und dürften auch aus diesem Grunde vermutlich Artefakte sein.
Abbildung 4 zeigt eine Metaphase mit 21 Chromosomen, Abbildung 5 eine diploide Metaphase II.

6.2.4. Zentrische Fusionen

In einem Fall (Gruppe 2) wiesen zwei Chromosomen ein gemeinsames Zentromer auf. Es bestehen mindestens zwei Möglichkeiten für das Zustandekommen einer solchen Struktur:
1. Durch eine Translokation nach zentromernahen Brüchen in akrozentrischen Chromosomen, der eine im langen, der andere im kurzen Arm des anderen Chromosoms, ensteht ein großes und ein kleines metazentrisches Chromosom. Wenn das kleine verlorengeht findet man nur noch das große, metazentrische Chromosom anstelle zweier akrozentrischer Chromosomen. Man nennt diesen Vorgang auch Robertsonsche Translokation.
2. Brüche in der Zentromerregion oder in den kurzen Armen zweier akrozentrischer Chromosomen können zu einem großen Chromosom mit zwei dicht benachbarten, metazentrisch gelegenen Zentromeren und einem azentrischen kleinen Chromosom führen; letzteres geht alsbald verloren ("Tandemfusion").
Mit herkömmlichen Färbemethoden ist in vielen Fällen nicht zu entscheiden, ob es sich tatsächlich um die Fusion zweier Zentromere handelt oder ob zwei zufällig dichtbenachbarte Zentromere eine solche vortäuschen. Deshalb wurde diese Metaphase nicht bei der Berechnung der Rate struktureller Aberrationen berücksichtigt.
In Organismen, deren Chromosomen Satelliten enthalten, werden außerdem Satellitenassoziationen beschrieben; in der Literatur sind die oben beschriebenen Erscheinungen oft unter dem Begriff Satellitenassoziation zusammengefaßt.

Eine andere Struktur, die ebenfalls in einem Falle auftrat (Gruppe 2, zusammen mit zwei Ringen in einer Metaphase), ist die Anlagerung eines dritten Chromatids an eines der

akrozentrischen Chromosomen (s. Abb. 6a).

6.2.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt. Es ist zu beachten, daß die Zahl der aberranten Metaphasen von der Summe der einzeln aufgeführten Aberrationen abweicht, wenn verschiedene Aberrationen in einer Metaphase gefunden wurden. In einem Fall wies eine Metaphase (Gruppe 2) zwei Ringe, zwei Fragmente und das oben beschriebene Chromosom mit zusätzlichem Chromatid auf. In Gruppe 4 wurde eine Metaphase mit zwei Fragmenten beobachtet.
Von den insgesamt beobachteten Aberrationen (inclusive Gaps und zentrischer Fusion, ohne Hypoploidien; n=59) sind 86,4% (n=51) Aberrationen, die bei ihrer Entstehung einen Bruch der DNS voraussetzen; es sind dies Brüche, Fragmente, Deletionen und Ringe. Nur diese Gruppe von Aberrationen zeigt auch ein dosisabhängig erhöhtes Vorkommen in den mit Mitomycin C behandelten Mäusen. Für die restlichen beobachteten Aberrationen, also Gaps, Diploidien, Hyperploidien sowie die in ihrem Entstehungsmechanismus unklaren zentrischen Fusionen konnte keine Steigerung der Häufigkeit mit erhöhter Mitomycin C-Dosis festgestellt werden. In Abbildung 3 sind die Ergebnisse für Metaphasen mit numerischen Aberrationen getrennt dargestellt.
Der dosisabhängig steigende Anteil der strukturellen Aberrationen bei etwa gleichbleibendem Anteil von numerischen Aberrationen zeigt deutlich, daß Mitomycin C bevorzugt strukturelle Aberrationen induziert hat.
In Abbildung 3 wurde bei der Kontrollgruppe 0% aberrante Metaphasen eingesetzt, da unter 162 Metaphasen keine Aberration gefunden wurde. Setzt man den korrekteren, aber zeichnerisch nicht darstellbaren Wert: 0,62% ein, so wird deutlicher, daß bei den numerischen Aberationen kein Effekt des Mitomycin C vorliegt.

Tabelle 5 Chromosomenaberrationen in Oozyten der Maus nach Gabe von Mitomycin C

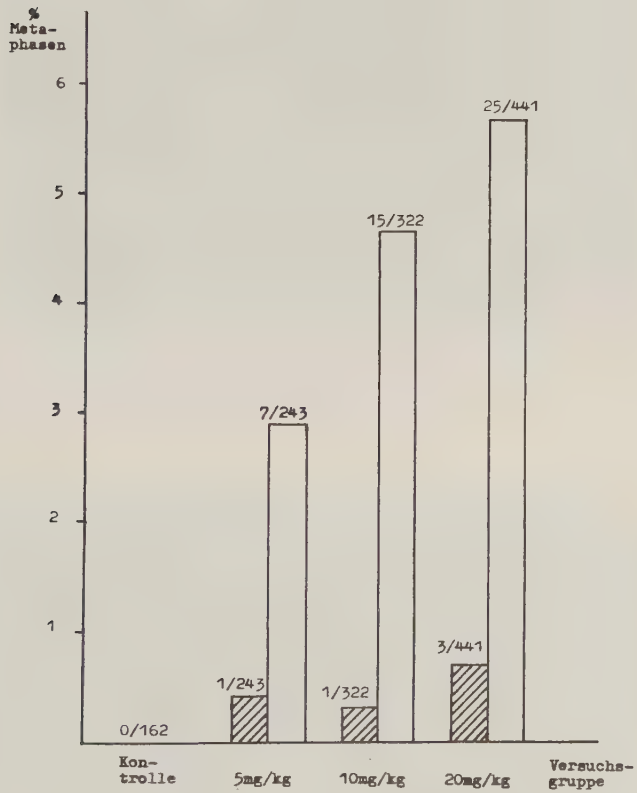
Versuchsgruppe	Mitomycin C pro Maus (mg/kg)	ausgewertete Metaphasen	aberrante Metaphasen 1)	aberrante Metaphasen in %1)	p-Werte	Metaphasen mit B	F	R	D	CV	2n	n=21	zF	G
1	0	162	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5	243	8[2)]	3,3	0,01	1	5	1	1	0	1	0	1	0
3	10	322	16	5,0	< 0,005	2	3	0	2	8	1	0	0	0
4	20	441	28	6,3	< 0,005	12	7	0	5	1	1	2	0	2

1) ohne Hypoploidien, Gaps und zentrische Fusionen
2) die Summe der aberranten Metaphasen entspricht nicht der Summe der einzeln aufgeführten Aberrationen, da Metaphasen mit mehreren Aberrationen verschiedener Art auftreten.

B = Brüche, F = Fragmente, R = Ringe, D = Deletionen, CV = Chromatidverlust, 2n = diploide Metaphase II, n=21 = Metaphase II mit 21 Chromosomen, zF = zentrische Fusion, G = Gap

Die Versuchsbedingungen und Kriterien der Auswertung sind im Text beschrieben. Die p-Werte beziehen sich auf einen einseitigen χ^2-Test.

Abbildung 3 Anteil der Metaphasen mit strukturellen und numerischen Aberrationen an den auswertbaren Metaphasen nach Mitomycin C-Mutagenese



▨: Metaphasen mit numerischen Aberrationen (Hyperploidien und diploide Metaphasen II)

□: Metaphasen mit strukturellen Aberrationen (ohne zentrische Fusionen und Gaps)

Über den Balken sind die Zahlen der Aberrationen sowie der auswertbaren Metaphasen angegeben.

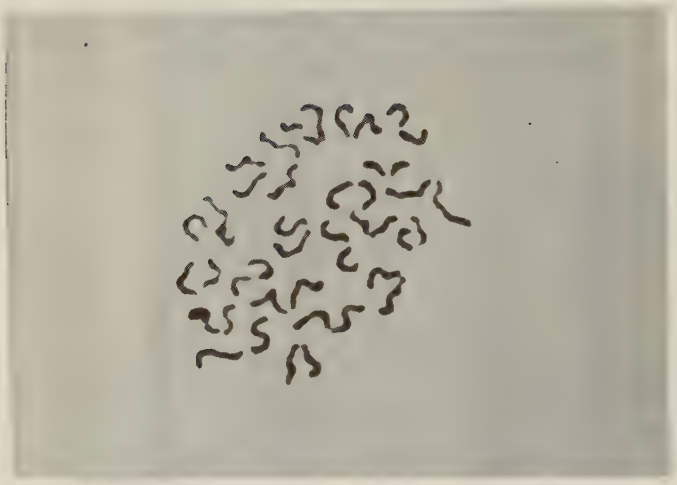


Abbildung 4: Metaphase II mit 21 Chromosomen

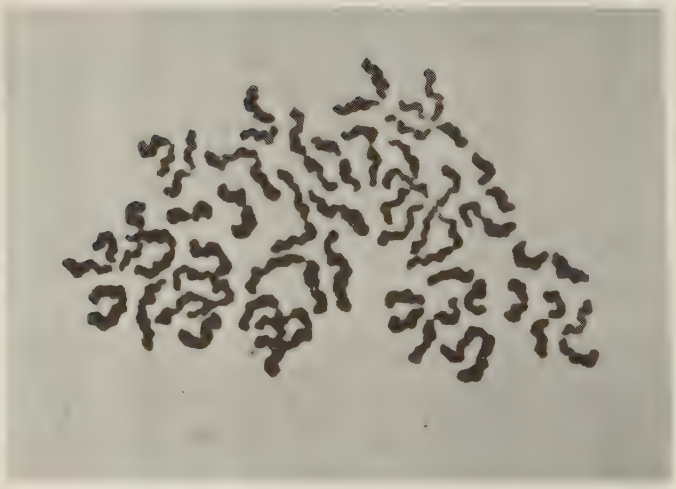
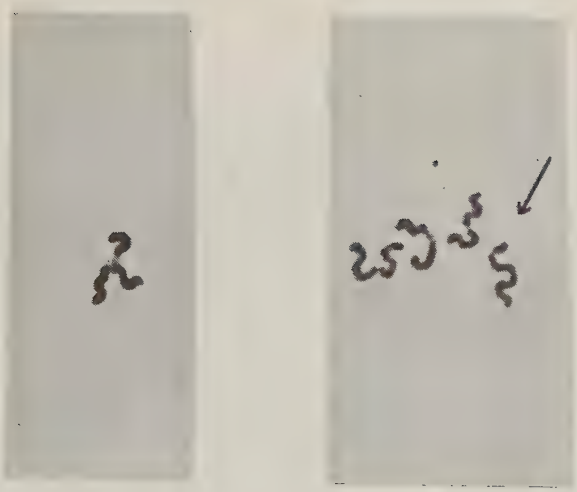


Abbildung 5: Diploide Metaphase II



a b

Abbildung 6: a) Assoziation eines einzelnen Chromatids an ein akrozentrisches Chromosom
b) Deletion

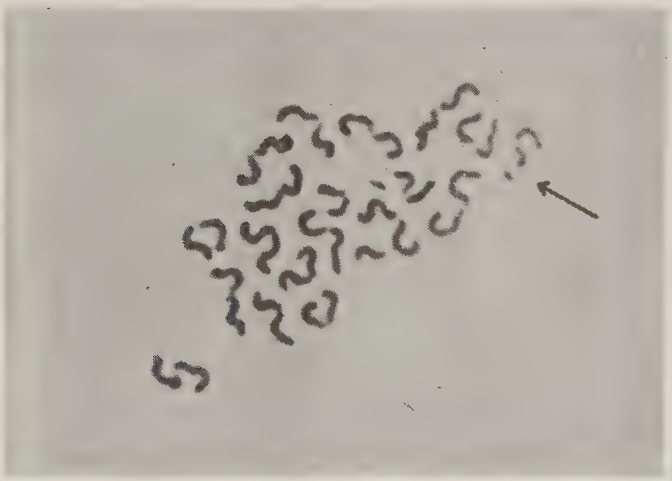


Abbildung 7: Metaphase II mit einem Bruch und einem Chromatidverlust

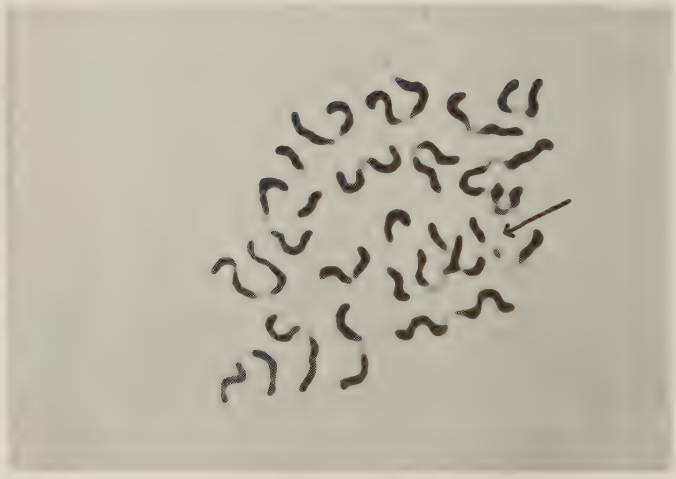


Abbildung 8: Metaphase II mit einem Bruch

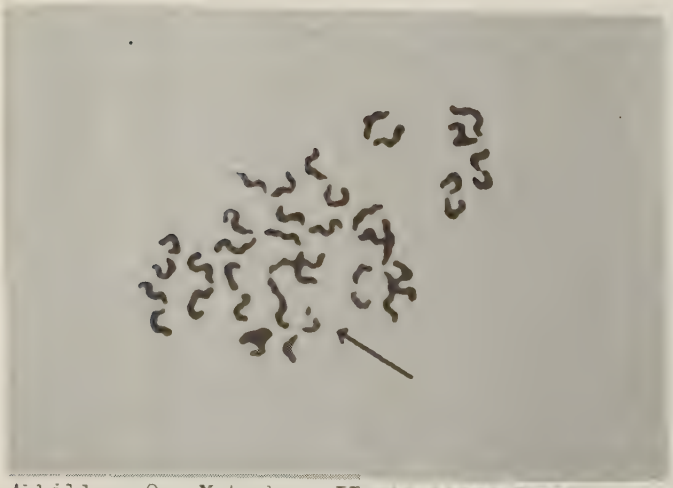


Abbildung 9: Metaphase II mit einem Bruch

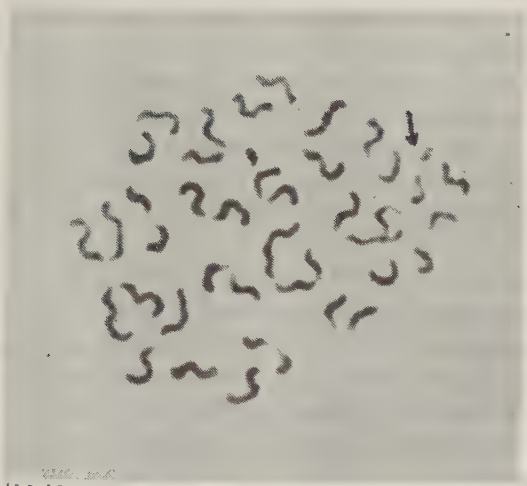


Abbildung 10: Metaphase II mit einem Bruch

7. Diskussion

In der Kontrolle (Gruppe 1) wurden in 162 Metaphase II-Oozyten keine Aberrationen festgestellt. Dieses Ergebniss steht in Einklang mit anderen Untersuchungen an NMRI-Mäusen. Basler und Röhrborn (1976) fanden unter 105 Metaphase II-Oozyten eine Satellitenassoziation (s.6.2.4.), Basler et al (1977) beobachteten in 122 Metaphasen ebenfalls nur eine Satellitenassoziation. In diesen beiden Arbeiten wurden also auch weniger als 1% Aberrationen in unbehandelten Mäusen gefunden.

Die in Gruppe 2 (5mg/kg Mitomycin C) beobachteten 3,3% aberrante Metaphasen bedeuten eine schwach erhöhte Aberrationsrate an der Grenze der Signifikanz ($p=0,01$). Die Ergebnisse der Gruppen 3 (10mg/kg) und 4 (20mg/kg) zeigen mit 5,0% ($p<0,005$) beziehungsweise 6,3% ($p<0,005$) aberrante Metaphasen eine deutlich signifikante Erhöhung der Aberrationsrate. Es kann also festgestellt werden, daß Mitomycin C in dosisabhängiger Weise Aberrationen an den Chromosomen der Oozyten hervorruft.

Die Bevorzugung DNS-Bruch bedingter Aberrationen stimmt mit den Vorstellungen über die Wirkungsweise von Mitomycin C bei der Mutagenese überein (s. 4.4.). In anderen Untersuchungen wurde eine Erhöhung der Frequenzen von Deletionen, Brüchen, Fragmenten, Interchanges, aber zum Teil auch von den nicht bruchbedingten Gaps und numerischen Aberrationen beschrieben. Die mit verschiedenen Systemen gewonnenen Ergebnisse unterscheiden sich jedoch quantitativ und qualitativ. So fanden zum Beispiel Manyak und Schleiermacher (1973) in Spermatogonien eine andere Verteilung der Aberrationstypen als in den Knochenmarkszellen derselben Tiere. Insgesamt kann festgestellt werden, daß Mitomycin C auch in den bisherigen Untersuchungen vorwiegend Aberrationen hervorgerufen hat, die eine gesteigerte Bruchhäufigkeit der DNS voraussetzen. Die von Adler (1976) beschriebene Häufigkeit von Aneuploidien in Spermatozyten ist eine Ausnahme und mag darauf zurückzuführen sein, daß bei der Darstellung

der Spermatozytenchromosomen Hyperploidien als Artefakte auftreten können, da hierbei viele Spermatozyten zugleich auf einen Objektträger gebracht werden. Bei der Fixierung kann es dann vorkommen, daß einzelne Chromosomen in den Bereich benachbarter Zellen gelangen und deren Chromosomensatz verstärken.
Das Fehlen von Interchanges in der vorliegenden Untersuchung kann darauf zurückzuführen sein, daß zu ihrer Entstehung wie bei der Bildung von Ringchromosomen zwei Brüche notwendig sind. Ein solches Doppelereigniss ist natürlich seltener. Morad et al (1973) konnten in menschlichen Lymphozyten nach Ablauf der S-Phase zwar Brüche, aber keine Interchanges mit Mitomycin C induzieren, was in der G_1-Phase noch möglich war. Auch das Fehlen einer S-Phase in den Oozyten könnte also dazu beitragen, daß Interchanges hier seltener enstehen. Das Fehlen der S-Phase erklärt auch, daß die strukturellen Aberrationen mit einer Ausnahme (Ringchromosom) vom Chromatid-Typ sind. Aberrationen vom Chromosomen-Typ entstehen bekanntlich in der Regel aus Chromatidenaberrationen durch Replikation des mutierten Chromatids.
Eine Reihe von Untersuchungen weisen die S-Phase als die sensitivste Phase des Zellzyklus aus (Nowell, 1964; Adler 1976; Shah, 1975). Unter Berücksichtigung aller bisher angewandten Testsysteme erkennt man jedoch, daß Mitomycin C auch in der G_1- und G_2-Phase Mutationen hervorzurufen vermag. Das kann mit der Reparatur-DNA-Synthese zusammenhängen, falls eine Abhängigkeit der Mitomycin C-Mutagenität von der DNS-Synthese besteht.

Auffällig häufig wurde der Verlust eines Chromatids beobachtet (9 Metaphasen mit Chromatidverlust gegenüber 8 mit sonstigen Deletionen). In diesem Zusammenhang ist interessant, daß bei der Maus an den akrozentrischen Zentromeren das Heterochromatin lokalisiert ist (Jones, 1970). Merz (1961) fand, daß bei Vicia faba die Mitomycin-induzierten Brüche gehäuft in Bereich der nucleolus-organizer und im Heterochromatin zu beiden

Seiten der Zentromere auftreten. Andere Untersucher bestätigen die Bevorzugung heterochromatischer Regionen (Rao und Natarajan, 1967; Natarajan und Ahnström, 1969; Utsumi, 1971), auch bei Säugerzellen (Natarajan und Raposa, 1975a und 1975b; Natarajan und Schmid, 1971; Shah, 1975), bei der Mitomycin C-Mutagenese. Organismen, deren Chromosomen wenig oder gar kein konstitutives Heterochromatin enthalten sind zudem gegen die mutagene Wirkung von Mitomycin C resistenter als vergleichbare Organismen (Natarajan und Ahnström, 1969; Utsumi, 1971; Shah, 1975). Bei Untersuchungen an menschlichen Zellkulturen traten Mitomycin C induzierte Chromosomenaberrationen gehäuft an den sekundären Konstriktionen der Chromosomen 1, 9, und 16 auf (Cohen und Shaw, 1964; Cohen, 1969; Brogger und Johansen, 1972; Brogger, 1974). Diese Bezirke sind ebenfalls heterochromatinreich (Arrhigi und Hsu, 1971). Morad et al (1973) und Bourgeois (1974) wiesen mit Hilfe von Banding-Techniken eine nicht zufallsgemäße Verteilung von Mitomycin C induzierten Aberrationen nach. Adler (1974) weist darauf hin, daß auch bei den Chromosomen der Maus das konstitutive Heterochromatin bevorzugtes Substrat für die Mitomycin C-Mutagenese zu sein scheint. Ayraud et al (1975) beschreiben eine Häufung von Mitomycin C induzierten Brüchen an den Zentromeren menschlicher Lymphozytenchromosomen. Diese Untersuchungen sprechen dafür, daß die in dieser Arbeit relativ häufig festgestellten Chromatidenverluste auf die Bevorzugung des zentromernahen Heterochromatins bei der Mitomycin C-Mutagenese zurückzuführen sein dürften. Zudem fand sich in der Kontrolle kein Chromatidverlust. Läge bei dieser Struktur ein Artefakt durch Trennung der Chromatiden an ihrer Bindungsstelle vor, etwa durch mechanische Einflüsse, so hätten auch häufiger Metaphasen vorliegen müssen, bei denen beide Chromatiden des auseinandergerissenen Chromosoms zu finden gewesen wären; das war nicht der Fall.

Um Artefakte dürfte es sich jedoch in der vorliegenden Untersuchung bei der überwiegenden Mehrzahl derjenigen Metaphasen handeln, die weniger als zwanzig Chromosomen enthielten (Hypo-

ploidien). Bei der Fixierung können unter Umständen einzelne Chromosomen von der Metaphase derart weggespült werden, daß es trotz intensivstem Suchen nicht mehr gefunden werden kann. Oft wurde ein wesentlich häufigeres Vorkommen von Hypoploidien als an Hyperploidien bei der Darstellung von Metaphase II-Chromosomen der Oozyten beschrieben (z.B. Röhrborn und Hansmann, 1971; Basler et al, 1977). Röhrborn und Hansmann wiesen bereits darauf hin, daß es sich bei der Mehrzahl dieser "Hypoploidien" um Artefakte handeln kann. Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit Metaphasen mit weniger als 20 Chromosomen nicht als Aberrationen gewertet.

Bei der Untersuchung der Mutagenität von Mitomycin C mit anderen Testsystemen der Maus, so zum Beispiel dem dominant-letal-Test (Ehling, 1971a), dem specific-locus-Test (Ehling, 1974) oder der Darstellung von Chromosomen in Spermatozyten (Adler, 1973, 1974, 1976) wurden ebenfalls positive Ergebnisse registriert. Bei diesen Tests wurde die verabreichte Dosis immer niedriger als 8mg/kg gewählt, da die toxische beziehungsweise zytotoxische Wirkung des Mitomycin C in diesen Tests eine höhere Dosierung nicht zuließ. Bei der Darstellung der Metaphase II-Chromosomen in den Oozyten der Maus führte selbst die Applikation von 20mg/kg Mitomycin C weder zu Verlusten von Versuchstieren noch zu verminderten Zahlen von Oozyten (s, Tab.4). Das dürfte einerseits darauf zurückzuführen sein, daß die Mäuse schon 16 Stunden nach der Applikation aufgearbeitet werden, und das andererseits die Oozyten einer geringeren Selektion unterliegen als die Spermatozyten. Das bei diesem Test höhere Dosen notwendig waren um eindeutig signifikante Ergebnisse zu erzielen, kann daher nicht als nachteilig bezeichnet werden.

Die im Vergleich zu anderen Testsystemen niedrigeren Aberrationsraten mögen auf das Fehlen einer S-Phase zurückzuführen sein, die für viele Mutagene das sensitivste Stadium

des Zellzyklus darstellt.Trotzdem trat die mutagene Wirkung des Mitomycin C in den Oozyten der Maus deutlich in Erscheinung.

8. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die mutagene Wikung von Mitomycin C auf die Oozyten der Maus. Mitomycin C ist ein Antibioticum, daß zur zytostatischen Therapie verwendet wird. Nach der Methode von Röhrborn und Hansmann (1971) wurden Chromosomen durch zytologische Aufarbeitung unbefruchteter Metaphase II-Oozyten dargestellt. Neben einer Kontrollgruppe von 50 Mäusen, die kein Mitomycin C erhielten, wurden je 50 Mäusen 5, 10 oder 20mg/kg Mitomycin C intraperitoneal injiziert. In 162 Metaphasen II der Kontrollgruppe konnten keine Veränderungen an den Chromosomen festgestellt werden. Unter 243 Metaphasen der Mäuse, die 5mg/kg Mitomycin C erhielten, waren 8 aberrante Metaphasen (3,3%), bei Applikation von 10mg/kg waren 16 von 322 Metaphasen aberrant (5,0%), und bei 20mg/kg 28 von 441 (6,3%). Mitomycin C erhöht die Aberrationsrate in Oozyten der Maus signifikant und dosisabhängig. Die überwiegende Zahl der aberranten Metaphasen wiesen strukturelle Aberrationen der Chromosomen auf, die mit einer Ausnahme (Ringchromosom) vom Chromatidtyp waren. Daneben wurden an Aberrationen noch Hyperploidien, diploide Metaphasen II, Gaps und eine zentrische Fusion beobachtet. Hypoploidien wurden aus methodischen Gründen nicht ausgewertet. Interchanges, die in einer Reihe anderer Testsysteme mit Mitomycin C induziert werden konnten, wurden nicht festgestellt.
Die Darstellung von Chromosomen der Metaphase II-Oozyten der Maus erlaubte eine recht hohe Dosierung des Mitomycin C, da bei dieser Methode die toxischen und zytotoxischen Wirkungen dieser Substanz nicht so stark zur Auswirkung kamen wie bei einer Reihe anderer in vivo-Testsysteme. Das wird einerseits darauf beruhen, daß die Mäuse schon 16 Stunden nach Applikation der Substanz aufgearbeitet wurden, und daß andererseits die Oozyten einer geringeren Selektion unterliegen als beispielsweise die Spermatozyten.

9. Literaturverzeichnis

Adler, I-D.: Cytogenetic analysis of meiotic chromosomes of male mice after treatment with mitomycin C. Mut. Res. 21, 20-21, (1973)

Adler, I-D.: Comparative cytogenetic study after treatment of mouse spermatogonia with mitomycin C. Mut. Res. 23, 369-379, (1974)

Adler, I-D.: Aberration induction by mitomycin C in early primary spermatocytes of mice. Mut. Res. 35, 247-256, (1976)

Allen, J.W., S.A. Latt: In vivo BRDU-33258 Hoechst analysis of DNA replication kinetics and sister chromatid exchange formation in mouse somatic and meiotic cells. Chromosoma 58, 325-340, (1976a)

Allen, J.W., S.A. Latt: Analysis of sister chromatid exchange formation in vivo in mouse spermatogonia as a new test system for environmental mutagens. Nature 260, 449-451, (1976b)

Alper, M., B.N. Ames: Positive selection of mutants with deletions of the gal-chl region of the salmonella chromosome as a screening procedure for mutagens that cause deletions. J. Bact. 121, 259-266, (1975)

Ames, B.N., W.E. Durston, e. Yamasaki, F.D. Lee: Carcinogens are mutagenes: a single test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2281-2285, (1973)

Arrhigi, F.F., T.C. Hsu: Localisation of heterochromatin in human chromosomes. Cytogenetics 10, 81-86, (1971)

Ayraud, N., C. Cantrelle, M. Lloyd: Effects de la mitomycin C sur la structure des chromosomes humaines observes en metaphase apres marquage pur demonstration thermique menagu. C. R. Soc. Biol. 169, 1573-1578, (1975)

Baker, T.G., L.L Franchi:	The structure of chromosomes in human primordial oocytes. Chromosoma 22, 358-377, (1967)
Basler, A., B. Herbold, S. Peter, G. Röhrborn:	Mutagenecity of polycyclic hydrocarbons. II. Monitoring genetical hazards of chrysene in vitro and in vivo. Mut. Res. 48, 249-254, (1977)
Basler, A., G. Röhrborn:	Chromosome aberrations in oocytes of NMRI mice and bone-marrow cells of chinese hamsters induced with 3,4-benzpyrene. Mut. Res. 38, 327-332, (1976)
Bast, R.C., M. Segerling, S.H. Ohanian, S.C. Green, B. Zbar, H.J. Rapp, T. Borast:	Regression of established tumors and induction of tumor immunity by intratumor chemotherapy. J. Natl. Cancer Inst. 56, 829-832, (1976)
Bempong, M.H., Y.L. Newsome:	The effect of adenosine triphosphate on mitomycin C induced aberration yield in Vicia faba. J. Genet. Cytol. 14, 655-660, (1972)
Bieliavinsky, N.:	Effects de la mitomycin sur l'incorporation de la thymidine tritiée dans les embryones d'amphibiens au stade morula. Exptl. Cell Res. 32, 342, (1963)
Blandau, R.J., B.J. White, R.E. Rumery:	Observations on the movements of living primordial germ cells in the mouse. Fertil. Steril. 14, 482-489, (1963)
Borum, K.:	Oogenesis in the mouse. Exptl. Cell Res. 24, 495-507, (1961)
Boué, J.G., A. Boué, P. Lazur:	Les aberrations chromosomiques dans les avertment spontanés humaines. Presse. méd. 14, 633-641, (1970)
Bourgeois, C.A.:	Distribution of mitomycin C induced damage in human chromosomes with special refernce for the regions with repetitve DNA. Chromosoma (Berl.) 48, 203-211 (1974)

Boyce, R.P., P. Howard-Flanders: Genetic control of DNA breakdown and repair in E. coli K12 treated with mitomycin C or ultraviolett light. Z. Vererbungslehre 95, 345-350, (1964)

Brogger, A., J. Johansen: A model for the production of chromosome damage by mitomycin C. Chromosoma (Berl.) 38, 95-104, (1972)

Brogger, A.: Different patterns of chromosome exchange induced by methyl-methansulfonate and mitomycin C in human cells. Hereditas 77, 205-208, (1974)

Bulmer, D., S. Stocco, J. Morrow: Bromodeoxyuridine induced variations in the level of alkaline phosphatase in several human heteroploid cell lines. J. Cell Physiol. 92, 221-231, (1976)

Cattanach, B.M.: Comparison of the mutagenic effect of chemicals and ionizing radiation in the spermatogonial cells of mouse In: Nygard, O.F. et al (eds.) Radiation research, biomedical, chemical and physical perspectives. Academic Press, New York, 984-992 (1975)

Chatterjee, A., A.K. Pal, T. Gupta: Pregnant mares serum gonadotropin. III. Hemispaying and the reversal of the antifertility faculty of pregnant mares serum gonadotropin. Fertil. Steril. 28, 1101-1103, (1977)

Cheer, S., T.T. Chen: Effect of mitomycin C on the synthesis of induces ß-galactosidase of E.coli. Biochem. Biophys. Res. Comm. 9, 271, (1962)

Cheer, S., T.T Chen: Effect of mitomycin C on induced enzyme sythesis of E.coli. Bacteriol. Proc. 38, (1968)

Chou, J.Y., J.C. Robinson: Induction of alkaline phosphatase in choriocarcinoma cells by 1-ß-D-arabinofuranosyl-cytosine, mitomycin C, phleomycin, and cyclic nucleotides.
J. Cell Physiol. 87, 357-365, (1977)

Cohen, M.M., M.W. Shaw: Effect of mitomycin on human chromosomes.
J. Cell Biol. 23, 386-395, (1964)

Cohen, M.M.: The interaction of various drugs with human chromosomes.
Can. J. Genet. Cytol. 11, 1-24, (1969)

Cole, R.S., R.R. Sinden: Repair of crosslinked DNA in E. coli. In: Hanawalt and Setlow (eds.), Molecular mechanisms for repair of DNA.
Plenum Press, New York and London, 487-495, (1975)

Comings, D.E.: Implication of somatic recombination on sister chromatid exchange in Bloom's syndrome and cells treated with mitomycin C.
Humangenetik 28, 191-196, (1975)

Cook, B., Karsch, F.J., D.L. Forster, A.V. Nalbandor: Oestrogene-induced luteolysis in ewe. Possible site of action.
Endocrinology, 94, 1197, (1974)

Edwards, R.G.: Mammalian eggs in the laboratory.
Scientific American 215, 73-81, (1966)

Edwards, R.G., A.H. Gates: Timing of the stages of the maturation divisions, ovulating, fertilisation and the first cleavage off eggs of adult mice treated with gonadotropins.
J. Endocrin. 18, 292-3o4, (1959)

Ehling, U.H.: Synergistic effects of mitomycin C and radiation on embryonic litter size reduction in mice.
Mut. Res. 13, 433-436, (1971) a

Ehling, U.H.: Comparison of radiation and chemically induced dominant lethal mutations in mice.
Mut. Res. 11, 35-44, (1971)b

Ehling, U.H., U. Neuhäuser: Induction of specific locus mutation by tumor inhibitors in male mice. In: A. Spiegel: The laboratory animal in drug testing. G. Fischer, Stuttgart, 331-338, (1973)

Ehling, U.H.: Differential spermatogonial response of mice to induction of mutations by antineoplastic drugs. Mut. Res. 26, 285-295, (1974)

Fornace, A.J., J.B. Little: DNA crosslinking induced by X-rays and chemical agents. Biochim. Biophys. Acta 477, 343-355, (1977)

Fowler, R.G., R.G. Edwards: Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotropins. J. Endocrin. 15, 374-384, (1957)

Fujiwara, Y., M. Tatsumi: Repair of mitomycin C damage to DNA in mammalian cells and its impairment in Franconi's anaemia cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 66, 592-598, (1975)

Funes-Cravioto, F., K. Yakovienko, N. Kuleshov, V.S. Zhurkov: Localysation of chemically induced breaks in chromosomes of human leucocytes. Mut. Res. 23, 87-105, (1974)

Garbridge, M.G., M.S. Legator: A host mediated assay for the detection of mutagenic compounds. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130, 831-834, (1969)

Gilliavod, N., A. Leonard: Tests for mutagenic effects of chemicals in mice. I. Effects of mitomycin C on spermatogonia. Mut. Res. 13, 274-275, (1971)

Green, M.H., W.J. Muriel, B.A. Bridges: Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. Mut. Res. 38, 33-42, (1976)

Hartley-Asp, B., B.A. Kihlman: Caffeine, caffeine derivates and chromosomal aberrations. IV. Synergism between mitomycin C and caffeine in chinese hamster cells. Hereditas 69, 326-328, (1971)

Hartley-Asp, B.: Enhancement by methylated oxypurines of the frequency of induced chromosomal aberrations. IV. The dependence of potentiation on the type of material. Hereditas 83, 223-226, (1976)

Hartung, M., A. Stahl: Preleptoten chromosome condensation in mouse oogenesis. Cytogenet. Cell Genet. 18, 309-319, (1977)

Hata, T., Y. Sano, R. Sugawara, A. Matsumae, K. Haramori, T. Shima, T. Hoshi: Mitomycin, a new antibiotic from streptomyces. I.J. Antibiot. (Tokyo) A9, 141, (1956)

Helmstetter, E.C., O. Pierucci: Cell division during inhibition of desoxyribonucleic acid synthesis in E.coli. J. Bact. 95, 1627-1633, (1968)

Hitosumachi, S., Y Kikuchi: Mitomycin C induced dominant lethality in mice. Mut. Res. 38, 336, (1976)

Holliday, R.: The induction of mitotic recombination by mitomycin C in Ustilago and Saccharomyces. Genetics 50, 323-335, (1964)

Huttner, K.M., F.H. Ruddle: Study of mitomycin C induced chromosomal exchange. Chromosoma 56, 1-13, (1976)

Iijima, T., A. Hagiwara: Mutagenic action of mitomycin C in Escherichia coli. Nature 185, 395-396, (1960)

Ikegami, R., J. Akamatsu, M. Haruta: Subcutaneous sarcomas induced by mitomycin C in mice. Acta. path. jap. 17, 495-501, (1967)

Inagaki, E., I.I. Oster: Changes in the mutational response of silkworm spermatozoa exposed to mono- and polyfunctional alkylating agents following storage. Mut. Res. 7, 425-432, (1969)

Isaacson, R.E., H.W. Moon: Induction of heat-labile enterotoxin sythesis in enterotoxigenic E. coli by mitomycin C. Infect. Immun. 12, 1271-1275, (1975)

Ito, T.: Teratogenesis of an anticarcinogen in mice. Cong. Anom. 7, 239-251, (1967)

Iyer, V.N., W. Szybalski: A molecular mechanism of mitomycin C action: linking of complementary DNA-strands. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 50 355-362, (1963)

Johnstone, G.R., A.U. Carrano: Mitomycin C induced sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of the indian muntjac. J. Cell. Biol. 75, 131a, (1977)

Jones, K.W.: Chromosomal and molecular location of mouse satellite DNA in individual cells. Nature 225, 912-915, (1970)

Karnofsky, D.A., B.D. Clarkson: Cellular effects of anticancer drugs. Ann. Rev. Pharmacol. 3, 357-418, (1963)

Karsch, F.J., G.P. Sutton: An intraovarian site for the luteolytic action of estrogen in the rhesus monkey. Endocrinology 98, 553, (1976)

Kato, H., H. Shimida: Sister chromatid exchange induced by mitomycin C: a new method of detecting DNA damage at chromosomal level. Mut. Res. 28, 459-464, (1975)

Kersten, H.: Action of mitomycin C on nucleic acid metabolism in tumor and bacterial cells. Biochim. Biophys. Acta 55, 558-560, (1962)

Kersten, H., W. Kersten: Inhibitors acting on DNA and their use to study DNA-replication and repair. In: T. Bücher und H. Sies: Inhibitors, tools in cell research. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 11-31, (1969)

Kobayashi, J.: The cytological effect of chemicals on tumors. X. On the effect of mitomycin C on two animal tumors. Cytologia 25, 280-289, (1960)

Kodama, M.: The interaction of mitomycin C with desoxyribonucleic acid in vitro. J. Biochem. 61, 162-167, (1967)

Kondo, S!, H. Ichiwara, K. Iwo, T. Kato: Base change mutagenesis and prophage induction in strains of E.coli with different DNA repair capacities. Genetics 66, 187-217, (1970)

Kram, D., M.L. Nieder, E.L. Schneider: Reduced frequencies of mitomycin C induced sister chromatid exchanges in AKR mice. J. Cell. Biol. 75, 123a, (1977)

Kuhlmann, W.: Cytology and timing of meiotic cell stages in female germ cells of mammals and man. In: F. Vogel und G. Röhrborn (eds.): Chemical mutagenesis in mammals and man. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1970)

Latt, S.A., G. Stetten, L.A. Jürgens, G.R. Buchanan, P.S. Gerald: Induction by alkylating agents of sister chromatid exchanges and chromatid breaks in Fanconi's anaemia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4066-4070, (1975)

Latt, S.A.: Sister chromatid exchanges, indices for human chromosome damage and repair: detection of fluorescence and induction by mitomycin C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3162-3166, (1974)

Lavialle, C., A.G. Morris, H.G. Suaarez, S. Estrade, J. Stevenet, R. Cassingena: Simian virus 40- chinese hamster kidney cells interaction. IV. Enhanced virus-replication in infected cells upon treatment with mitomycin C. J. Genet. Virol. 36, 137-149, (1977)

Lin, M.S., O.S. Alfi: Detection of sister chromatid exchanges by 4'-6-diamidino-2-phenylindole fluorescence. Chromosoma 57, 219-225, (1976)

Lipsett, M., A. Weissbach: The site of alkylation of nucleic acids by mitomycin C. Biochemistry 4 206-211, (1965)

Lown, J.W., A. Begleiter, D. Johnson, A.R. Morgan:	Studies related to antitumor antibiotics. Part V. Reactions of mitomycin C with DNA examined by ethidium fluorescence assay. Can. J. Bioch. 54, 110-119, (1975)
Mahony, D.E.:	Induction of bacteriocin from clostridium perfringens by treatment with mitomycin C. Antimicro. Agents Chemother. 11, 1067-1068, (1977)
Maier, P. D.B. Feldmann, G. Fiscor:	Host mediated assay in the rhesus monkey (Macaca mulatta): Mutagenicity of mitomycin C. Mut. Res. 57, 91-95, (1978)
Manheimer, L.H., J. Vital:	Mitomycin C in the therapy of far-advanced malignant tumors. Cancer 19, 207-212, (1966)
Manyak, H., E. Schleiermacher:	Action of mitomycin C on mouse spermatogonia. Mut. Res. 19, 99-108, (1973)
Merz, T.:	Effect of mitomycin C on lateral root tip chromosomes of Vicia faba. Science 133, 329-330, (1961)
Michelmann, H.W., P. Maier, G. Fiscor, D.B. Feldmann:	Bone marrow and lymphocyte cytogenetics of rhesus monkeys (Macaca mulatta) treated with the clastogen mitomycin C. Mut. Res. 57, 77-84, (1978)
Moore, P.D., R. Holliday:	Evidence for the formation of hybrid DNA during mitotic recombination in chinese hamster cells. Cell 8, 573-579, (1976)
Morad, M., J. Jonasson, J. Lindsten:	Distribution of mitomycin C induced breaks on human chromosomes. Hereditas 74, 273-281, (1973)
Morris, A.G., C. Lavialle, H.G. Suarez, J. Stevenet, S. Estrade, R. Cassingena:	Simian virus 40-chinese hamster kidney cell interaction III. Chracteristics of chemical induction in a clone of virogenic transformed cells. J. Gen. Virol. 36, 123-135, (1977)

Mukherjee, R.: Mutagenic action of mitomycin C on Drosophila melanogaster. Genetics 51, 947-951, (1965)

Murakami, H.: Electron aspects of the mode of action of the mitomycin molecule. J. Theoret. Biol. 10, 236-250, (1966)

Natarajan, A.T., G. Ahnström: Heterochromatin and chromosome aberration. Chromosoma (Berl.) 28, 48-61, (1969)

Natarajan, A.T., W. Schmid: Differential response of constitutive and facultative heterochromatin in the manifestation of mitomycin induced chromosome aberrations in chinese hamster cells in vitro. Chromosoma 33, 48-62, (1971)

Natarajan, A.T., T. Raposa: Proceedings: heterochromatin and chromosome aberrations; a comparative study of normal and tumor cells of mouse with various distribution of heterochromatin. Mut. Res. 29, 199-200,(1975)a

Natarajan, A.T., T. Raposa: Heterochromatin and chromosome aberrations. A comparative study of three mouse cell lines with different caryotypes and heterochromatin distribution. Hereditas 80, 83-90. (1975)b

Nowell, P.C.: Mitotic inhibition and chromosome damage by mitomycin in human leucocyte cultures. Exper. Cell. Res. 33, 445-449, (1964)

Ohno, S., J.B. Smith: Role of fetal follicular cells in the meiosis of mammalian oocytes. Cytogenetics, 3, 324-333, (1964)

Otsuji, M., M. Sekiguchi, T. Iijima, Y. Takagi: Induction of phage formation in the lysogenic E.coli K 12 by mitomycin C. Nature 184, 1079-1080, (1959)

Passarge, E.:	Population cytogenetics, assignment of gene loci to autosomes, caryotype-phenotype correlations. Humangenetik 9, 1-15, (1970)
Pekhov, A.P., S.N. Rudneva, V.V Pantyukheva:	Mutagenesis in the strains of E.coli K 12 with different ability to genetic recombination. J. Hyg. Epidmiol. Microbiol. Immunol. 20, 443-449, (1976)
Perlman, N.:	Prospects of the fermentation industries, 1974-1983. Chemtech., April, 212, (1974)
Perry, P., H.J. Evans:	Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. Nature 258, 121-125, (1975)
Peters, H., E. Levi, M. Crone:	Desoxyribonucleic acid synthesis in oocytes of mouse embryos. Nature 195, 915-916, (1962)
Philips, F.S., H.S.Schwartz, S.S. Sternberg:	Pharmakology of mitomycin C. I. Toxicity and pathologic effects. Cancer Res. 20, 1354-1361, (1960)
Rakusanova, T., J.C. Kaplan, W.P. Smales, P.H. Black:	Exision of viral DNA from host cell DNA after induction of simian virus 40-transformed hamster cells. J. Virol. 19, 279-285, (1976)
Rao, N., A.T. Natarajan:	Somatic association in relation to chemically induced chromosome aberrations in Vicia faba. Genetics 57, 821-835, (1967)
Reich, E., A.J. Shatkin, E.L. Tatum:	Bacteriocidal action of mitomycin C. Biochim. Biophys. Acta 53, 132-149 (1961)
Roberts, J.W., C.W. Roberts:	Proteolytic cleavage of bacteriophage repressor in induction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 147-151, (1975)
Röhrborn, G.:	Biochemical mechanisms of mutation. In: F. Vogel und G. Röhrborn (eds.): chemical mutagenesis in mammals and man. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1970)

Röhrborn, G., J. Hansmann: Induced chromosome aberrations in unfertilized oocytes of mice. Humangenetik 13, 184-198, (1971)

Ruzicska, P., A. Czeizel: Cytogenetic studies on mid trimester abortues. Humangenetik 10, 273-297, (1970)

Schewe, M.J., D.T. Suzuki, U. Erasmus: The genetic effects of mitomycin C in Drosophila melanogaster. I. Induced mutations and X-Y chromosomal interchanges. Mut. Res. 12, 255-267, (1971)

Schmähl, D., H. Oswald: Experimentelle Untersuchungen über carcinogene Wirkungen von Krebs-Chemotherapeutika und Immunsupressiva. Arzneimittel- Forsch. 20, 1461-1467, (1970)

Schubert. I., R. Rieger: Effect of pre- and simultaneous treatment with urea on the induction of chromatid aberrations in Vicia faba. Experimenta 32, 854-855, (1976)

Sekiguchi, M., Y Takagi: Synthesis of DNA by phage infected E.coli in the presence of mitomycin C. Nature 183, 1134-1135, (1959)

Shah, V.C.: Effects of some antibiotics on cell cycles of cultured and meristematic cells. In: G.P. Talwar (ed.): Regulation of growth and differentiated function in eucariotic cells. Raven Press, New York, 41-55, (1975)

Shatkin, A.J., E. Reich, M. Franklin, E.L. Tatum: Effect of mitomycin C on mammalian cells in culture. Biochim. Biophys. Acta 55, 277-289, (1962)

Shaw, M.W., M.M. Cohen: Chromosome exchanges in human leucocytes induced by mitomycin C. Genetics 51, 189-190 (1965)

Shiba, S., A. Terawaki, T. Taguchi, J. Kawamata: Selective inhibition of formation of desoxyribonucleic acid in E. coli by mitomycin C. Nature 183, 1056-1057, (1959)

Singh, J.D., S. Singh: Skeletal malformations induced by mitomycin C in chick embryos. Acta orth. scand. 47, 509-514, (1976)

Sirlin, J.L., R.G. Edwards: Timing of DNA-synthesis in ovarian oocyte nuclei and pronuclei of the mouse. Exper. Cell Res. 18, 190-194, (1959)

Smith, R.H.: Induction of mutations in habrobracon sperm with mitomycin C. Mut. Res. 7, 231-234, (1969)

Snell, G.D., L.C. Stevens: Early embryolygy. In: E.L. Green (ed.): Biology of the laboratory mouse. Mc Graw Hill Book Company, New York, Toronto, Sydney, London; (1966)

Surkowa, N.J., A.M. Malashenko: Cytogenetic effect of mitomycin C and cytosine arabinoside on mice of different genotypes. Genetika 11, 38-45, (1975)

Stetka, D.G., J. Minkler, A.V. Carrano, D.L. Piluso: Sister chromatid exchanges induced by repeated exposures to mutagen-carcinogens in vivo. J. Cell Biol. 132a, (1977)

Suzuki, D.T.: Effects of mitomycin C on crossing over in Drosophila melanogaster. Genetics 51, 635-630, (1965)

Szolgay, E., M. T'alas: Interferon synthesis in the mouse peritoneal cells damaged by X-irradiation. Intervirology 7, 338-345, (1976)

Szybalsky, W., V.N. Iyer: The mitomycins and porfiromycins. In: D. Gottlieb and P.D. Shaw (eds.): Antibiotics; Springer, Berlin, Heidelberg, New York; Vol.1, 211-245, (1967)

Szybalsky, W., V.N. Iyer: Crosslinking of DNA by enzymatically or chemically activated mitomycins and porfiromycins, bifunctionally "alkylating" antibiotics. Federation Proceedings 23, 946-957, (1964)

Takaya, M.: Teratogenic effects of antibiotics. J. Osaka City Med. Cent. 14, 107-115, (1965)

Terwaki, A., J. Greenberg: Post-treatment breakage of mitomycin C induced crosslinks in DNA of E.coli. Biochim. Biophys. Acta 199, 540-546, (1966)

Tomasz, M.: H_2O_2 generation during redox cycle of mitomycin C and DNA-bound mitomycin C. Chem. Biol. Interact. 13, 89-97, (1976)

Tsafiri, A., C.P. Channing: An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis in vitro. Endocrinology, 96, 922-927, (1975)

Tsuda, H.: An electron microscope study on the oogenesis in the mouse with special reference to the behaviour of oogonia and oocytes at meiotic prophase. Arch. Histol. Jap. 25, 533-555, (1965)

Tsukamura, S. M. Tsukamura: Mutagenic effect of mitomycin C on Mycobacterium and its combined effect with ultraviolet irradition. Japan. J. Microbiol. 6, 53-58, (1972)

Tyler, J., D.J. Shemat: Synthesis of the colicins in E.coli. Mol. Gen. Genet. 140, 349-353, (1975)

Utsumi, S.: Localized chromosome breakage induced by mitomycin C in Tradescantia palludosa and Vicia faba root tips. Jap. J. Genet. 46, 125-134, (1971)

Vig, B.K.: Genetic toxikology of mitomycin C, actinomycins, daunomycin and adriamycin. Mut. Res. 49, 189-238, (1977) (zitiert nach Kopf der Arbeit, diese befindet sich jedoch in Mut. Res. 39)

Wakaki, S., H. Marumo, K. Tomiaka, G. Shimizu, E. Kao, H. Kamada, S. Kudo, Y. Fugiomoto:	Isolations of new fractions of antitumor mitomycins. Antibiot. Chemotherapie 8, 228, (1958)
Walker, V.K., J.H. Williamson:	Genetic analysis of mitomycin C induced interchange in Drosophila melanogaster females. Mut. Res. 28, 227-237, (1975)
Webb, J.S., P.B. Cosulich, J.H. Mowat, J.B. Patrick, R.W. Broschard, W.E. Meyer, R.P. Williamson, C.F. Wolf, W. Fulmor, C. Pidacks, J.E. Lancaster:	The structure of mitomycin A, B, and C and porfiromycins - part I. J. Am. Chem. Soc. 84, 3185, (1962)
West, S.C., P.T. Emmerson:	Induction of protein-synthesis in E.coli following uv- or γ-irradiation, mitomycin C-treatment or TIF-expression. Mol. Gen. Genet. 151, 57-67, (1977)
White, J.R., H.L. White:	Phenetyl alcohol synergism with mitomycin C, porfiromycin, and streptonigrin. Science, 145, 1312-1313, (1964)
World Health Organisation (WHO):	Evaluation and testing of drugs for mutagenicity: principles and problems. WHO, Techn Rep. Ser. No. 482, Genf (1971)
Zamboni, L., H. Merchant:	The fine morphology of mouse primordial germ cells in extragonadal location. Am. J. Anat. 137, 299-336, (1973)
Zampieri, A., J. Greenberg:	Induction of mutations in the lac region of E.coli strain S. Genetics 57, 41-51, (1967)

Herrn Professor Dr. G. Röhrborn danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die Bereitstellung der Versuchstiere und der technischen Einrichtung.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Professor Dr. F.K. Ohnesorge für die Übernahme des Koreferates.

Lebenslauf

geboren:	17. März 1948
in:	Düsseldorf
Eltern:	Paul Hübinger, Kaufmann Elisabeth Hübinger, geb. Groten
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet seit dem 11. Mai 1973 mit Karin Hübinger, geb. Vorpahl, Studienrätin

Ausbildung:

1954-1959	Grundschule in Düsseldorf
1959-1967	Schloßgymnasium Benrath in Düsseldorf
1967	Reifeprüfung
1967-1972	Studium der Biologie an der Universität zu Köln
1972	Diplom-Hauptprüfung in Biologie, anschließend Anfertigung einer Diplomarbeit am Institut für Genetik der Universität zu Köln
1973-1975	Arbeit im Institut für Genetik der Universität zu Köln
1975	Beginn des Studiums der Medizin an der Universität Düsseldorf

FOTODRUCK J. MAINZ – Telefon: (02 41) 2 73 05
Neupforte 13, Nähe Markt, 5100 Aachen